

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-168163

(43)Date of publication of application : 28.06.1990

(51)Int.Cl.

G01N 33/543
C07K 17/08
C12N 11/08

(21)Application number : 63-324055

(71)Applicant : SEKISUI CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 22.12.1988

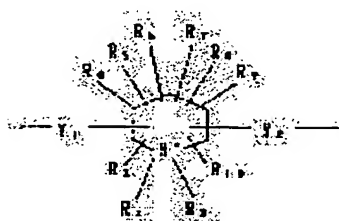
(72)Inventor : ISHIKAWA FUMIO

(54) CARRIER FOR IMMOBILIZING HYDROPHOBIC SUBSTANCE AND METHOD FOR IMMOBILIZING HYDROPHOBIC SUBSTANCE EMPLOYING SUCH CARRIER

(57)Abstract:

PURPOSE: To immobilize hydrophobic substance even in the existence of a substance weakening the hydrophobic mutual action by forming a carrier of an inactive carrier into which a cationic functional group is introduced or which absorbs a compound having a cationic functional group.

CONSTITUTION: For the inactive carrier, a carrier with the hydrophobic surface, for example, latex is used. For the cationic functional group, quaternary amino group and its salt are used. In order to introduce the cationic functional group into the carrier, for example, a compound containing a cationic functional group is arranged to be physically attracted to the surface of the carrier. For the compound, particularly, for the low molecular compound, dodecylamine or the other kinds of amine is used, and for the high molecular compound, a cationic polymer including a hydrophobic part is used. The hydrophobic part is composed of alkyl group or others. For the cationic polymer, a polymer containing fourth-class amino group represented by the formula is most preferable. In the formula, R1-R10 represent a hydrogen or alkyl group, Y1 and Y2 represent an alkyl or alkylene group which may contain S, N or O.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A)

平2-168163

⑬ Int. Cl. ⁵

G 01 N 33/543
C 07 K 17/08
C 12 N 11/08

識別記号

Q 7906-2G
8318-4H
Z 7329-4B

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)6月28日

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全11頁)

⑮ 発明の名称 疎水性物質の固定化用担体およびそれを用いた疎水性物質の固定化方法

⑯ 特 願 昭63-324055

⑰ 出 願 昭63(1988)12月22日

⑱ 発 明 者 石 川 文 雄 大阪府高槻市宮之川原2丁目8番28号

⑲ 出 願 人 積水化学工業株式会社 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

明 細 書

1. 発明の名称

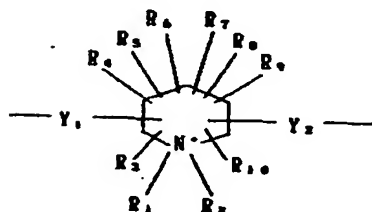
疎水性物質の固定化用担体およびそれを用いた疎水性物質の固定化方法

2. 特許請求の範囲

1. カチオン性の官能基が導入された、もしくはカチオン性の官能基を有する化合物を吸着した不活性担体でなる、疎水性物質の固定化用担体。

2. 前記カチオン性の官能基が4級アミノ基を包含する、特許請求の範囲第1項に記載の担体。

3. 前記カチオン性の官能基を有する化合物が、下記構造式(1)を有する化合物である、特許請求の範囲第1項に記載の担体：



... (1)

ここで、R₁～R₆は水素またはアルキル基、Y₁およびY₂はアルキル基またはアルキレン基であり、該Y₁およびY₂にはS、N またはOが含まれていてもよい。

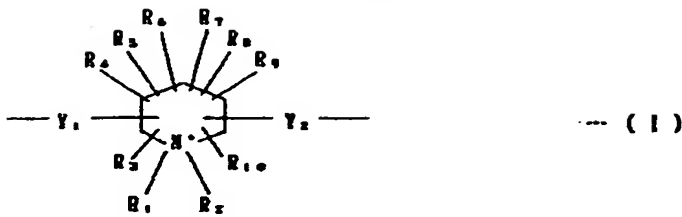
4. 特許請求の範囲第1項に記載の担体に疎水性物質を接触させて、該担体表面に該疎水性物質を物理的に吸着させることを包含する、疎水性物質の固定化方法。

5. 前記カチオン性の官能基が4級アミノ基を包含する、特許請求の範囲第4項に記載の固定化方法。

6. 前記カチオン性の官能基を有する化合物が、下記構造式(1)を有する化合物である、特許請求の範囲第4項に記載の固定化方法：

(以下余白)

(2)



ここで、 $R_1 \sim R_{10}$ は水素またはアルキル基、 Y_1 および Y_2 はアルキル基またはアルキレン基であり、該 Y_1 および Y_2 にはS、NまたはOが含まれていてもよい。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、疎水性物質の固定化用担体およびそれを用いた疎水性物質の固定化方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、界面活性剤のような疎水性相互作用を弱めるような物質の存在下においても疎水性物質を効果的に固定しうる固定化用担体およびそれを用いた疎水性物質の固定化方法に

固定化すべき物質を共有結合により固定化すればこの問題は解決され得る。しかし、共有結合を導入するための反応の制御が難しいうえ、場合によっては固定化した物質の活性を著しく損なうことがある。

特許公表公報63-501902号には、ラテックスをポリカチオン性ポリアミノ酸（ポリリジンまたはポリアルギニン）またはメチル化血清アルブミンで処理して物理的に吸着または化学的に結合させた後、カルジオリビン（梅毒抗体と特異的に反応する抗原作用を示すリン脂質）をイオンの吸着させることが開示されている。このようにして調製されたカルジオリビン結合ラテックスは、梅毒の診断に用いられる。しかし、上記ポリリジンおよびポリアルギニンは親水性アミノ酸のホモポリマーであり、親水性を示す。そのため、ポリリジンまたはポリアルギニンで疎水性物質であるラテックス、プラスチックビーズ、プラスチックプレートなどを処理しても、これらのアミノ酸ホモポリマーを効果的に導入することができない。また、

関する。

(従来の技術)

抗原抗体反応を利用した生理活性物質の測定を目的として担体上に抗原や抗体を固定化したり、酵素を担体上に固定化して固定化酵素を調製することが行なわれている。このような物質の固定化は、一般に、疎水性相互作用を利用して行なわれている。例えば、ラテックス、プラスチックビーズ、プラスチックプレートなどの疎水性の担体に、緩衝液中、生理食塩水中または精製水中で、固定化しようとする物質を直接接触させることにより固定化が達成される。しかし、上記従来の物理的な吸着による直接固定化法では、疎水性相互作用のみを利用しているため、吸着・固定化時の反応系中に界面活性剤などの疎水性相互作用を弱める物質が含まれていると固定化ができない。そのため、この物理的な吸着による直接固定化法は、抽出および/または安定化に界面活性剤を必要とする膜タンパク、脂質などの疎水性物質の固定化には利用できない。

リジンのε-アミノ基は1級アミノ基であり、pH 11以上ではほとんど解離が抑えられて荷電を持たなくなる。そのため、上記カルジオリビンのようにpH 11を下回るpH域で固定化し得る物質にはポリリジンを適用できるが、pH 11以上で固定化する必要のある生理活性物質には適用できないというような制約がある。そのため、例えばタンパクなどその他の生理活性物質については、不適切な場合もある。さらに、上記ポリリジンおよびポリアルギニンはアミノ酸のポリマー、すなわちポリペプチドであり、同じくポリペプチドであるタンパクを吸着固定化するには、これらの間の結合力が弱いため適さない。加えて、上記ポリリジンは高価であるうえ、生体に対して毒性を有するので、取扱いに注意を要する。

このように、上記従来の物質の固定化方法では、効率がよくないために固定化に多量の生理活性物質を必要とする；単位面積当りに固定化できる生理活性物質の量が少ない；広いpH領域での固定化できない；界面活性剤存在下での固定化ができな

い；などの問題点があった。

(発明が解決しようとする課題)

本発明は上記従来の課題を解決するものであり、その目的とするところは、界面活性剤などの疎水性相互作用を弱める作用を有する物質の存在下においても、生理活性物質などの疎水性物質を固定化しうる固定化用担体を提供することにある。

本発明の他の目的は、単なる物理吸着では固定化できなかつたり、固定化できたとしても十分な量ではないような疎水性物質を効果的に固定化しうる固定化用担体を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、上記優れた性質を有する固定化用担体を用いて、生理活性物質などの疎水性物質を効率よく固定化する方法を提供することにある。

(課題を解決するための手段)

本発明の疎水性物質の固定化用担体は、カチオン性の官能基が導入された、もしくはカチオン性の官能基を有する化合物を吸着した不活性担体であり、そのことにより上記目的が達成される。

れる。このようなカチオン性の官能基もしくはそれを含む化合物は、疎水性物質の固定化を妨害しない程度ならば、一部アニオンを含んでいてもよい。

担体に上記カチオン性の官能基を導入する方法としては、①担体として使用するプラスチックを合成する際にカチオン性の官能基を含むモノマーを同時に反応させて該基を有する担体を調製する方法；②担体を成形した後に、その表面に化学修飾によりカチオン性の官能基を結合させる方法；および③カチオン性の官能基を含む化合物（例えば、アミン類またはカチオン性ポリマー）を担体表面に物理的に吸着させる方法がある。①の方法としては、例えば、重合時にアミノ基を有するモノマーを同時に重合させる（例えば、ナイロンもしくはその誘導体を調製する）方法が挙げられる。②の方法としては、例えば、シリカのような無機材料を不活性担体として用い、該シリカのOH基を化学的に修飾する方法がある。③の方法に用いられる化合物として、低分子量化合物としては、

(3)

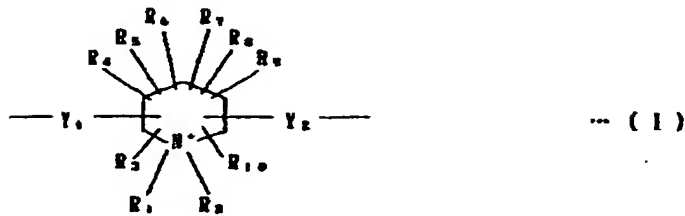
本発明の疎水性物質の固定化方法は、上記疎水性物質の固定化用担体に疎水性物質を接触させて、該担体表面に該疎水性物質を物理的に吸着させることを包含し、そのことにより上記目的が達成される。

本発明に用いられる不活性担体としては、疎水性の表面を有する、あるいは部分的に疎水性の表面を有する不活性担体がいずれも利用され得る。例えば、ラテックス、プラスチックビーズ、プラスチックプレートなどの合成高分子化合物でなる材料、タンニン酸で処理した赤血球などの有機材料；およびシリカなどの無機材料が挙げられる。特に、工業的に安定した品質で大量生産しうるラテックス；またはプラスチックビーズ、プラスチックプレートなどのプラスチック成形品が好適に使用される。このような不活性担体に導入もしくは吸着させるカチオン性の官能基には、1級、2級、3級または4級のアミノ基およびそれらの塩が挙げられる。カチオンとして作用しうるpH範囲が広い4級アミノ基およびその塩が好適に使用さ

ドデシルアミン、ヘキサデシルトリメチルアミンなどの各種アミン類が、高分子量化合物としては疎水性部分を含むカチオン性ポリマーが用いられる。該ポリマーの疎水性部分は、アルキル基、アルキレン基、フェニル基などから成る。該アルキル基およびアルキレン基の炭素数は、1～15個の範囲内にあるものが適当である。これよりも大きな炭素数では、ポリマーが水に溶解しにくくなり、担体を処理するのが困難となる。ポリマーの分子量は1,000～400,000が適当である。これよりも小さい分子量では、担体との疎水性相互作用が十分ではなくなり、担体に効果的に吸着されない。400,000を上回る分子量では、ポリマーの粘度が高くなってしまい、担体を処理するのが困難となる。

このようなポリマーとしては、ポリアリルアミン（1級アミノ基を有する；日東紡績調製）、ポリエチレンジアミン（2級アミノ基を有する）、ポリ塩化ジアリルジメチルアンモニウム、ポリアミンスルホン（4級アミノ基を有する）、核酸など

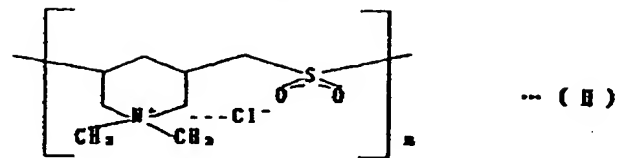
がある。例えば、次式 (I) で示される 4 級アミノ基を有するポリマーが好適である：



ここで、 $R_1 \sim R_6$ は水素またはアルキル基、 Y_1 および Y_2 はアルキル基またはアルキレン基であり、該 Y_1 および Y_2 には S、N または O が含まれていてもよい。

特に、次の構造式 (II) で示されるポリアミンスルホン (日東紡、PAS-A-5、平均分子量 2,000 ~ 5,000) が好適である：

(以下余白)



本発明の担体に固定化されるべき物質は、疎水性の部分を持ち、かつ固定化条件下で負の電荷を有する物質である。このような物質としては、タンパクなどの生理活性物質、脂質などが挙げられる。特に、抽出、安定化などのために界面活性剤を必要とする物質、例えば、ウィルス抗原、梅毒トレポネーマなどの菌体の表面抗原、細胞膜上に存在する各種抗原、膜タンパク、リセプター、酵素などは本発明の担体および方法により効果的に固定化される。

上記菌体の表面抗原、膜タンパクなどの抽出や安定化のために用いられる界面活性剤としては、非イオン性、両性およびカチオン性の界面活性剤

が使用できるが、アニオン性の界面活性剤は適当ではない。非イオン性の界面活性剤としては、例えば、トリトン X、ツイーン 20、ツイーン 80、オクチルグルコシド、オクチルチオグルコシド、ヘプチルチオグルコシド、HEGA-8 (オクタノイル-N-メチルグルカミド：Octanoyl-N-methylglucamide)、HEGA-9 (ノナノイル-N-メチルグルカミド：Nonanoyl-N-methylglucamide)、HEGA-10 (デカノイル-N-メチルグルカミド：Decanoyl-N-methylglucamide) などが挙げられる。両性の界面活性剤としては、例えば、CHAPS (3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート：3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)、CHAPSO (3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート：3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propane-sulfonate) などが挙げられる。カチオン性の界面活性剤としては、ドデシルアミン (Dodecyl amine)、ヘキサデシルトリメチルア

ンモニウムブロマイド (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide) などが挙げられる。

本発明方法による上記のような疎水性物質の担体への固定化は、緩衝液、生理食塩水または精製水に疎水性物質を溶解した溶液を固定化用担体に接触させることにより行われる。このことにより疎水性物質はまず、イオンの相互作用により担体表面のカチオン性官能基に引き寄せられ、次いで担体との疎水性相互作用により該担体表面に固定化される。このときに使用される緩衝液としては、当業者に公知のいずれの緩衝液も使用できるが、イオン強度が 0.1M を下回るものが望ましい。本発明方法は疎水性物質の固定化の最初のステップとしてイオンの相互作用を利用しているので、イオン強度が高いと効果が得られない。緩衝液の pH は、担体上のカチオンが解離しており、固定化される物質が該緩衝液中で安定に存在し得、かつ負に荷電するような pH に調整される。ただし、担体上のカチオンとして 4 級アミノ基を用いる場合には、どの pH においても担体上のカチオンは解離し

ているので比較的広いpH範囲の緩衝液が使用され得る。

本発明の担体および方法は、特にRIA、EIA、ラテックス法などのための免疫診断試薬の調製に好適に利用される。例えば、HBs抗原、HBc抗原、HBe抗原、梅毒抗原（トレポネーマ抗原および脂質抗原）、HIV抗原、ATLV抗原などの抗原を適当な担体に固定した種々の免疫診断試薬を調製するのに利用できる。

本発明によりこのような免疫診断試薬を調製する場合に、測定系の特異性を高めたり測定感度を上げたりするために、場合によっては塩化コリン、EDTA、糖類（多糖類、デキストランなど）、ポリエチレングリコールのような親水性ポリマーなどを反応系に添加することもできる。このようにして調製された免疫診断試薬は、疾病の診断および治療のための臨床検査などの分野に広く利用され得る。さらに、固定化酵素を調製し、これを用いて特定の物質を生産する方法にも利用され得る。（実施例）

レンイミンP-70（平均分子量70,000；和光純薬社製）を精製水で希釈して1%水溶液とした。

1M塩酸：塩酸を精製水で希釈して1M塩酸水溶液とした。

1%BSA：リン酸緩衝液に牛血清アルブミンを1%となるように溶解した。

1%トリトンX-100：リン酸緩衝液にトリトンX-100を1%となるように溶解した。

梅毒抗原液：家兎睾丸中で10～14日間培養したトレポネーマパリダム [*Treponema pallidum*; CDC (Center for Disease Control, Public Health Service, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Atlanta, Georgia) より入手したものを家兎睾丸に接種し、雄代培養したものをを用いた] を生理食塩水中に 10^8 個菌体/mlとなるように懸濁した菌体懸濁液1mlを採り、リン酸緩衝液中で遠心分離(6,000rpm×5分、3回)することにより洗浄した。次いで、得られた沈澱に1%トリトンX-100を1ml添加し、37℃にて30分間インキュベートした。その後、これを超遠心分離

(5)

本発明を以下の実施例につき説明する。

実施例1

【界面活性剤存在下における梅毒トレポネーマ抗原のプラスチックプレートへの固定化】

(A) 試薬および検体の調製

以下の試薬および検体を調製して用いた。

リン酸緩衝液：リン酸ナトリウム（2水和物）、リン酸二ナトリウム（2水和物）および塩化ナトリウムを、リン酸および塩化ナトリウムの終濃度がそれぞれ0.02Mおよび0.15M、そしてpHが7.4となるように混合して調製した。

リン酸-クエン酸緩衝液：0.2Mリン酸二ナトリウムと0.1Mクエン酸とを混合し、pH5.5に調整した。

1%ポリアミンスルホン水溶液：ポリアミンスルホン（日東紡、PAS-A-5、平均分子量2,000～5,000）を水に溶解して1%水溶液とした。このポリアミンスルホンの構造式は明細書中の(II)式で示される。

1%ポリエチレンイミン水溶液：30%ポリエチ

機にかけて(50,000rpm×1時間)上清を採取し、1%トリトンX-100で1,000倍希釈して使用した。

梅毒陽性家兎血清：睾丸にトレポネーマパリダムを接種後、45日間飼育した家兎から血清を採取した。市販のTPHAキット（セロディアTP（富士レビオ）、およびセロクリットTP（化血研））を用いてタイター（力価）を測定したところ、いずれのキットにおいても10,000タイターを示した。この血清を1%BSAで100倍から400倍に希釈して使用した。

正常家兎血清：トレポネーマパリダムが接種されていない家兎から採取した血清を用いた。上記と同様に市販のTPHAキットを用いてタイターを測定したところ、結果は陰性を示した。この血清を1%BSAで100倍から400倍に希釈して用いた。

ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG：ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG（マイルズ・ラボラトリーズ社）を1%BSAで1,000倍に希釈して用いた。

マイクロタイタープレート：プラスチック製の

96穴(ウェル)マイクロタイタープレート(ヌンク社)を用いた。

ペルオキシダーゼ基質: o-フェニレンジアミン(2塩酸塩)および過酸化水素水を、リン酸-クエン酸緩衝液にそれぞれ2mg/mlと0.03%となるように溶解した。基質の調製は使用直前に行った。

1M 硫酸: 濃硫酸を精製水で希釈して1M 硫酸水溶液とした。

(B) マイクロタイタープレートの処理

〔ポリアミン処理〕

マイクロタイタープレートの各ウェルに、1%ポリアミンスルホン水溶液または1%ポリエチレンジアミン水溶液(以下、ポリアミンスルホンおよびポリエチレンジアミンを総称してポリアミンとする)を50μlずつ分注し、室温にて1時間放置した。その後、アスピレーターを用いてポリアミン水溶液を除去し、各ウェルを200μlの精製水で3回、次いで1M塩酸200μlで1回、最後にリン酸緩衝液200μlで1回吸引洗浄した。

〔抗原の固定化〕

家血清と同様にウェルに分注した。これらのウェルを室温にて1時間インキュベートした後、液を吸引除去し、200μlの1%BSAで3回吸引洗浄した。次いで、第2抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGを100μlずつ各ウェルに分注し、室温にて1時間インキュベートした。その後、ウェル内の液を吸引除去し、上記と同様にウェルを200μlの1%BSAで3回吸引洗浄した後、各ウェルにペルオキシダーゼ基質を100μl添加し、室温にて正確に15分間インキュベートした。基質ブランクとして、第1抗体および第2抗体のいずれも添加していないウェルを用意し、同様に基質液を添加してインキュベートした。その後、1M硫酸100μlを添加することによって酵素反応を停止させた。反応停止後、マイクロタイタープレートリーダー(HTP-100、コロナ社)を用いて、基質ブランクを対照として492nmにおける吸光度を測定した。結果を表1に示す。

比較例1

ポリアミン処理を行わなかったマイクロタイタ

このマイクロタイタープレートのウェルに梅毒抗原液50μlを添加し、室温にて1時間インキュベートした。対照として、梅毒抗原液の代わりに1%BSAを50μl分注したウェルを用意した。インキュベートの後、梅毒抗原液および1%BSAを吸引除去し、200μlの1%BSAで3回吸引洗浄した。次いで、200μlの1%BSAを添加し、室温にて1時間放置してブロッキングを行った。その後、1%BSAを吸引除去し、直ちにELISA分析に使用した。

(C) ELISA 分析

第1抗体として前記の100倍、200倍および400倍希釈した梅毒陽性家兎血清100μlを使用した。これを上述のように調製した梅毒抗原固定化マイクロタイタープレートの各ウェルに分注した。対照のウェル(梅毒抗原の代わりに1%BSAで処理した)にも同様に梅毒陽性家兎血清を分注した。別に、血清中の非特異的吸着を示す物質の存在の有無を調べるために、前記の100倍、200倍および400倍希釈した正常家兎血清を上記梅毒陽性家

ープレートを用いて、実施例1を繰り返した。結果を実施例1の結果とともに表1に示す。

表1

血 清	血清の 希釈率 (倍)	吸光度(492nm)・		
		実施例1 ポリアミンスルホン	実施例1 ポリエチレンジアミン	比較例1
正常家兎	400	0.036	0.042	0.040
	200	0.042	0.055	0.038
	100	0.112	0.141	0.072
梅毒陽性 家兎	400	0.337	0.252	0.055
	200	0.718	0.677	0.042
	100	1.118	1.967	0.108

*n=4で測定したときの平均値。

表1の結果から明らかなように、従来の単なる物理的吸着法では界面活性剤存在下において梅毒抗原をプラスチックプレートに固定化することは難しい。しかし、本発明によれば、界面活性剤存在下においても効果的に梅毒抗原をプラスチックプレートに固定化することができる。

実施例2

〔界面活性剤存在下における梅毒トレポネーマ

抗原のラテックスへの固定化]

(A) 試薬および検体の調製

特に指示されないかぎり、実施例1と同一名の試薬および検体は実施例1と同様に調製した。

ラテックス: 0.23 μ m ポリスチレンラテックス (固形分10%, 積水化学工業株) を用いた。

(B) ラテックスの処理

〔ポリアミンスルホン処理〕

ラテックス 1ml と 1%ポリアミンスルホン水溶液 5ml を混合し、室温にて1時間放置した。その後、遠心分離 (15,000rpm \times 1時間) することによりポリアミンスルホン水溶液を除去し、1mH塩酸 5ml で3回遠心洗浄 (15,000rpm \times 1時間) した。さらに、精製水 5ml で同様に3回遠心洗浄した後、ラテックスの固形分が10%となるように精製水に懸濁し、この状態で使用するまで保存した。

〔抗原の固定化〕

上記のようにポリアミンスルホン処理したラテックス 200 μ l と梅毒抗原液 800 μ l とを混合し、室温にて1時間攪拌した。その後、1%BSA 5ml

(7)

を添加し、15,000rpm にて1時間遠心分離した。得られた沈澱にさらに1%BSA 5ml を添加し、同様に遠心分離することにより沈澱を洗浄した。この沈澱に1%BSA 4ml を添加し、よく分散させてラテックス試薬とした。このようにして調製したラテックス試薬は、4 $^{\circ}$ C にて保存した。

(C) 免疫凝集法による分析

梅毒陽性家兎血清と上述のように調製したラテックス試薬とをそれぞれ50 μ l ずつガラス板上に採り、攪拌混合して3分間反応させた。対照として、正常家兎血清についても同様に反応させた。反応後、ラテックス試薬の凝集の有無を目視観察することにより判定し、凝集が観察された場合を陽性 (+)、そして凝集が観察されなかった場合を陰性 (-) とした。結果を表2に示す。

比較例2

ポリアミンスルホン処理を行わなかったラテックス試薬を用いて、実施例2を繰り返した。結果を実施例2の結果とともに表2に示す。

表2

血 清	血清の 希釈率 (倍)	判 定*	
		実施例2	比較例2
正常家兎	400	—	—
	200	—	—
	100	—	—
梅毒陽性 家兎	400	+	—
	200	+	—
	100	+	—

*+: 陽性
—: 陰性

表2の結果から明らかなように、従来の単なる物理的吸着法では界面活性剤存在下において梅毒抗原をラテックスに固定化することは難しい。これらに対して、本発明によれば、界面活性剤存在下においても効果的に梅毒抗原をラテックスに固定化でき、免疫診断試薬とすることができる。

実施例3

〔界面活性剤不在下におけるHBs 抗原のプラスチックプレートへの固定化〕

(A) 試薬および検体の調製

HBs 抗原液: HBs 陽性のヒト血清を、家兎産生抗HBs 抗体をセファロースCL4Bに結合させたアフィニティカラムを用いてアフィニティ精製した。この精製HBs 抗原をリン酸緩衝液に溶解してHBs 抗原液とし、濃度をローリー法により測定した。HBs 抗原液は、抗原固定化に使用する直前にリン酸緩衝液で希釈し、濃度を1~10 μ g / ml に調整して用いた。

抗HBs 抗血清: 精製HBs 抗原をフロイドの完全アジュバントとともに家兎に免疫して得られた抗HBs 血清を、正常ヒト血清を結合させたCXB活性化セファロースCL4Bカラム (ファルマシア社) により吸収処理した。このカラムによる吸収処理は、製造業者の使用説明書に従って行った。吸収処理を行った抗HBs 血清は、実施例1と同様に1%BSA で100倍から400倍に希釈して用いた。

(B) マイクロタイタープレートの処理

〔ポリアミンスルホン処理〕

マイクロタイタープレートの各ウェルを、実施

(8)

例1に準じてポリアミンスルホン処理した。このポリアミンスルホンで処理したマイクロタイタープレートに、直ちにHBs抗原を固定化した。

(抗原の固定化)

固定化の工程は、梅毒抗原液の代わりにHBs抗原液を用いたことを除いては実施例1と同様である。このHBs抗原固定化マイクロタイタープレートは、直ちにELISA分析に使用した。

(C) ELISA 分析

第1抗体として梅毒陽性家兎血清の代わりに抗HBs抗血清を用いたことを除いては、実施例1に準じて測定を行った。492nmにおける吸光度を測定した結果を表3に示す。

比較例3

ポリアミンスルホン処理を行わなかったマイクロタイタープレートを用いて、実施例3を繰り返した。結果を実施例3の結果とともに表3に示す。

(以下余白)

定化した場合(比較例4)とを比較した。

実施例4

(A) 試薬および検体の調製

特に指示されない限り、実施例1～3と同一名の試薬および検体は実施例1～3と同様に調製した。

カルジオライピン(カルジオリピン)溶液: カルジオライピン、レシチンおよびコレステロールをそれぞれ0.03%、0.21%、および0.9%の割合で含有するエタノール溶液を調製した。

(B) ラテックスの処理

梅毒抗原液の代わりにカルジオライピン溶液を用いたこと以外は実施例2(B)項と同様に操作を行なった。

(C) 免疫凝集反応による分析

(B)項で得られたラテックス試薬を用い、実施例2(C)項に準じて操作を行なった。その結果を表4に示す。

比較例4

1%ポリアミンスルホン水溶液の代わりにポリ-

表3

血 清	血清の希釈率(倍)	吸光度(492nm)*	
		実施例3	比較例3
正常家兎	400	0.039	0.047
	200	0.051	0.092
	100	0.101	0.099
HBs陽性家兎	400	0.488	0.212
	200	0.975	0.458
	100	1.386	0.969

*n=4で測定したときの平均値。

表3の結果から明らかなように、本発明によれば、従来の単なる物理的吸着法よりも効果的により多量のHBs抗原をプラスチックプレートに固定化することが可能である。

次に、ポリアミンスルホンを用いてカルジオライピンを担体上に固定化した場合(実施例4)と、公表公報63-501902号に記載されているようにポリリジンを用いてカルジオライピンを担体上に固

定化した場合(比較例4)とを比較した。DL-リジンの1%水溶液を用いたこと以外は実施例4と同様である。その結果を表4に示す。

表4

血 清	血清の希釈率(倍)	判定*	
		実施例4	比較例4
正常家兎	400	-	-
	200	-	-
	100	-	-
梅毒陽性家兎	400	+	-
	200	+	+
	100	+	+

* + : 陽性

- : 陰性

表4から明らかなように、本発明によれば、ポリリジンと同等もしくはそれ以上の効率で、カルジオライピンの固定化が可能である。ポリアミンスルホンはポリリジンと異なり毒性を持たない点で有利である。

次に、ポリアミンスルホン（実施例5）およびポリリジン（比較例5）を用いてカルジオライピンを固定化した場合のpHの条件を比較した。

実施例5

(A) 試薬および検体の調製

特に指示されない限り、実施例1～4と同一名の試薬および検体は、実施例1～3と同様に調製した。

ホウ酸緩衝液：ホウ酸水溶液のpHを水酸化ナトリウムで調整し、0.01Mホウ酸緩衝液（pH9.2）を調製した。

1% BSA/ホウ酸緩衝液：ホウ酸緩衝液に牛血清アルブミンを1%になるように溶解させた。

(B) ラテックスの処理

実施例2(B)項と同様にラテックスをポリアミンスルホンで処理し、固形分10%になるようにホウ酸緩衝液に懸濁した状態で保存した。この保存状態においてラテックスの凝集は認められなかった。

たが、そのまま実施例5と同様の操作を行なった。その結果を表5に示す。

表5

血 清	血清の希釈率 (倍)	判定*	
		実施例5	比較例5
正常家兎	400	—	—
	200	—	—
	100	—	—
梅毒陽性家兎	400	+	—
	200	+	+
	100	+	+(弱い)

* +：陽性

—：陰性

実施例5ではポリアミンスルホンによるラテックスの処理でラテックスの凝集が起こらないが、比較例5ではラテックスの凝集が認められた。さらに実施例5ではカルジオライピン固定化後の抗原抗体反応も強く、高いpHでも、従来の1級アミンに比べて効率よくカルジオライピンが固定化されることが確認された。

(9)

上記のようにポリアミンスルホン処理をし、ホウ酸緩衝液に懸濁したラテックス200 μ lとカルジオライピン溶液800 μ lとを混合し、室温で1時間攪拌した。これに1% BSA/ホウ酸緩衝液を5 μ l加え、15000rpmで1時間遠心分離した。得られた沈殿に1% BSA 5 μ lを加え、15000rpmで1時間遠心分離することにより沈殿を洗浄した。この沈殿に4 μ lの1% BSAを加え、よく分散しラテックス試薬とした。ラテックス試薬は4℃で保存した。

(C) 免疫凝集法による分析

(B)項で得られたラテックス試薬を用い、実施例2(C)項に準じて操作を行なった。その結果を表5に示す。

比較例5

1%ポリアミンスルホン水溶液の代わりにポリ-DL-リジンの1%水溶液を用いたこと以外は実施例5と同様である。

本比較例では、ポリリジンで処理したラテックスをホウ酸緩衝液に懸濁したときに凝集が見られ

次に、アミノ基が導入されている高分子材料を用いて、本発明を実施する例を、高分子材料としてナイロンを例に取り説明する。

実施例6

(A) 試薬および検体の調製

特に指示されない限り、実施例1～5と同一名の試薬および検体は実施例1～3と同様に調製した。

エチレンジアミン：特級試薬を用いた。

塩酸：ナイロンビーズの表面を加水分解するために1Nの塩酸を用いた。

EDC（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド）：エチレンジアミンのアミノ基とナイロンのカルボキシル基を結合させるための縮合剤（カルボキシル基の活性化剤）として用いた。

ナイロンビーズ：6-ナイロンを直径6.4 mmの球状に成形したもの（積水化学工業製、ナイロンビーズ、#0）を用いた。

(B) 梅毒抗原の固定化

ナイロンビーズ100個を100mlの塩酸に浸漬し、37℃で1時間加水分解し、精製水により十分洗い風乾した。これを0.1 Mエチレンジアミン50mlに浸漬し、攪拌しながら、EDCを粉末のまま1g加えた。室温で1時間反応させた後、精製水により十分洗い風乾した。このようにして表面処理を行なったナイロンビーズ20個を50mlのビーカーに入れ、梅毒抗原液10mlを加え、室温で1時間攪拌した。次に、梅毒抗原液を吸引除去し、1%トリンX-100を25ml加えた後、吸引除去する操作を3回繰り返して洗浄した。BSAを25ml加え、梅毒抗原固定化ナイロンビーズとした。この梅毒抗原固定化ナイロンビーズは4℃で保存した。対照として、抗原液の代わりに1%BSAを用いて同じ操作を行なったものを調製した。

(C) EIA による梅毒抗体の検出

第1抗体として、前述の100倍、200倍および400倍に希釈した梅毒陽性家兔血清500μlずつを分注した。別に、血清の非特異的吸着を示す物質の存在の有無を調べるために、前述の100倍、

(10)

200倍および400倍に希釈した正常家兔血清を同様に試験管に分注した。

各試験管に、上記梅毒抗原固定化ナイロンビーズを2個ずつ加えた。対照として、抗原の代わりに1%BSAを固定化した表面処理ナイロンビーズも同様に加えた。

上記試験管を室温で1時間インキュベート後、反応液を吸引除去し、2mlの1%BSAで3回吸引洗浄した。これにペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGを各試験管に500μlずつ分注し、室温で1時間インキュベートした。反応液を吸引除去し、2mlの1%BSAで3回吸引洗浄した。

次に、各試験管に500μlずつ酵素基質を添加し、室温で、15分間インキュベートを行なった。基質ブランクとして、空の試験管にも同様に基質を分注し、インキュベートした。これに1N硫酸を2ml添加し、酵素反応を停止させた。各試験管の酵素反応時間は一定になるように注意して行なった。反応停止後、分光光度計（日立製作所、UV-3200）により、基質ブランクを対照として492nm

の吸光度を測定した（n=2）。その結果を表6に示す。

実施例7

塩酸による加水分解のみを行なったナイロンビーズ（すなわち、実施例6におけるエチレンジアミンおよびEDCによる処理を行わないナイロンビーズ）を用いて、実施例6と同様の操作を行なった。その結果を表6に示す。

比較例6

ナイロンビーズと同じ金型で成形されたポリスチレンビーズ（積水化学工業調製、ポリスチレンビーズ#0）を用い、実施例6と同様の操作を行なった。その結果を表6に示す。

（以下余白）

表6

血 清	血清の 希釈率 (倍)	吸光度(492nm)		
		実施例6	実施例7	比較例6
正常家兔	400	0.056	0.047	0.055
	200	0.042	0.035	0.045
	100	0.153	0.098	0.047
梅毒陽性 家兔	400	0.447	0.112	0.058
	200	0.879	0.283	0.044
	100	1.313	0.772	0.101

n=2 で測定したときの平均値

表6から明らかなように、カチオン性の官能基が共有結合により導入された場合にも、高感度で梅毒抗体が検出され、かつ非特異反応が低いことが確認された。

実施例7においては比較例6に比べ、ある程度梅毒陽性家兔血清との反応が認められる。これは、ナイロンビーズの加水分解により生成したアミノ基が存在するためと考えられる。ナイロンビーズは加水分解によりカルボキシル基をも生じるが、このカルボキシル基（アニオン性の官能基である）

による測定時の妨害は特に認められない。

(発明の効果)

本発明によれば、このように、疎水性物質が効果的に担体上に固定化される。例えば、従来の単なる物理吸着では固定化できない、あるいは単位面積あたりの固定化量が少ない生理活性物質が、ラテックス、プラスチックプレート、無機担体、赤血球などの不活性担体に効果的に固定化される。そのため本発明の担体および固定化方法は、例えば免疫反応を利用した種々の物質の測定に利用される。特に疾病の診断および治療のための臨床検査などの分野に広く利用され得る。

以 上

出願人 積水化学工業株式会社

代表者 廣 田 徳